

Исследование взаимодействия некоторых вирусов гриппа и окисленного олигографена.

*В.Н. Буравцев¹, В.Т. Иванова², Я.Е. Курочкина², Л.А. Баратова³, А.В. Тимофеева³, А.С. Ботин^{1,4},
А.В. Николаев¹, А.И. Полетаев^{5,1}*

¹Институт химической физики РАН, г. Москва

²НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, г. Москва

³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ, г. Москва

⁴НИИ Скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, г. Москва

⁵Московский физико-технический институт (государственный университет), г. Долгопрудный

Широкое распространение вредных, токсических для людей веществ, патогенных микроорганизмов, в том числе и вирусов, ставит вопрос о дезактивации и удалении их из окружающей среды. Известно, что для удаления вирусов из растворов существует два методических подхода – ультрацентрифугирование и сорбция их на сорбенты. Одним из таких сорбентов могут быть углеродсодержащие вещества. В частности, активированный уголь является активным сорбентом как для токсических веществ, присутствующих как в газах, так и в жидкостях [1]. Различия в составе и способе получения угля могут определить и свойства последнего как сорбента. Поэтому представлялось важным исследовать в качестве сорбента другое углеродсодержащее вещество – Окисленный ОлигоГрафен (ООГ), полученный из модифицированного графита [2] с помощью гидротермической обработки. В качестве сорбирующего вещества были взяты вирусы гриппа, обладающие наружной белковой оболочкой, с различными антигенными свойствами.

Материалы и методы. Для изучения взаимодействия вируса с сорбентом были взяты эталонные и эпидемические штаммы вируса гриппа А(Н1N1, Н3N2) и В изолированные в период 1977-2005гг, обладающие различной структурой поверхностных белков и соответственно свойствами, а также, приготовленные к ним иммунные крысиные сыворотки. Были исследованы вирусы гриппа: А(Н1N1)-А/Новая Каледония/20/99, эпидемические штаммы 2005 г. изоляции А/Ставрополь/55/05, А/Ставрополь/56/05 ; А(Н3N2) - А/Техас/1/77, А/Филиппины/2/82, А/Сичуань/2/87, А/Калифорния/7/04, реассортант А/ Х-31, полученный в 1969г. [3]; вирусы гриппа В: В/Гонконг/330/02, В/Шанхай/361/02, принадлежавшим двум эволюционным ветвям, подобным В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88 соответственно. Все вирусы были взяты из коллекции Центра экологии и эпидемиологии гриппа НИИ вирусологии РАМН. Вирусы были культивированы в куриных эмбрионах, очищены в градиенте концентрации сахарозы 10-50% при 22 000 об/мин., сконцентрированы при 25 000 об/мин в течение часа. Ультрацентрифугирование проводили в центрифуге L 5-50 . Вирусы ресуспендировали в физиологическом растворе (ФР) или STE (0.01M Трис-НСl, 0,1M NaCl, 0,001M ЭДТА рН 7,4).

Для определения вируса в растворе использовали реакцию гемагглютинирующей активности (РГА), для определения антител в сыворотках – реакцию торможения гемагглютинирующей активности (РТГА). В реакциях применяли 0,75% взвесь эритроцитов 0 (1) группы крови человека. Определение концентрации белка в препаратах проводили по методу Лоури [4].

Результаты. Как исходное вещество для получения сорбента был взят Окисленный ОлигоГрафен (ООГ). Для устранения возможных побочных эффектов и увеличения эффективности взаимодействия с водорастворимыми комплексами исходное вещество осаждали в воду на магнитной мешалке ММ-5 при температуре кипения. Этот одностадийный процесс приводил к удалению газовой фазы с поверхности и изменению плотности ООГ. Обработанный таким образом ООГ включал частицы с насыпной плотностью 0,01 до 0,03 г/см³ и характерным размером частиц от 20 до 100 мкм. В результате обработки доступная для вирусных частиц, находящихся в жидкой фазе, поверхность увеличивалась и соответственно увеличивалась адсорбционная способность вещества. Для дальнейших исследований, включающих связывание вирусных частиц из вирусосодержащих жидкостей, сорбент переносили в среду с нейтральным рН. Процедура сорбции вирусов была следующая. Сорбент добавляли к вирусосодержащему раствору. Для активного контакта вируса с сорбентом реакционная смесь помещала на шейкер. После контакта вируса с сорбентом смесь центрифугировали при 2 000тыс об/мин в течение 4 мин, надосадочную жидкость исследовали на наличие вируса в РГА. Осадок - иммуносорбент, содержащий сорбент и иммобилизованный вирус, исследовали в экспериментах по десорбции вируса, а также по сорбции антител на иммуносорбент.

Сорбция вирусов изучалась в зависимости антигенной вирусов гриппа А и В, а также от разных условий эксперимента.

Также были взяты эталонные штаммы вирусов гриппа А(Н3N2), изолированные в разные годы 1971-2005 г., имеющих значительные отличия в структуре гемагглютинина и в том числе антигенной, эталонные и эпидемические штаммы вирусов гриппа А (Н1N1), а также эталонные вирусы гриппа В, различных эволюционных линий, имеющих существенные различия в антигенной структуре гемагглютинина. Исследования сорбции разных штаммов вирусов гриппа А и В на сорбент показало, все вирусы успешно взаимодействовали с сорбентом независимо от антигенных свойств поверхностных белков. Вирусы гриппа А и В сорбировались на ООГ из вирусосодержащих жидкостей: буферных растворов, аллантоисной жидкости куриных эмбрионов. В опытах навески сорбента варьировались от 50 до 200 мг при постоянном объеме вирусосодержащей жидкости V= 200 мкл. Начальные титры вирусов, исследуемых в данном эксперименте, в пересчете на 1 мг сорбента находились в диапазоне от 0,6 до 200 гемагглютинирующих единиц (ГЕ). Конечные титры в пересчете на 1 мг сорбента варьировались от 0,04 до 1,7ГЕ. Падение гемагглютинирующего титра вирусов гриппа, содержащихся в растворе после сорбции, происходило в 4 -- 256 раз, в зависимости от концентрации вирусов.

Выводы. Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что Окисленный ОлигоГрафен (ООГ), после гидротермической обработки, способен в широком диапазоне температур в короткое время сорбировать на себя вирусы гриппа А и В независимо от их антигенной структуры. Имобилизованные вирусы сохраняли возможность соединяться с антителами, содержащимися в иммунных сыворотках, приготовленных к вирусам гриппа. Полученные данные могут быть использованы в серологических реакциях для определения специфичности антител к вирусу гриппа, а также для удаления вирусов из резервуаров, зараженных вирусами гриппа птиц. Это особенно важно, поскольку в последние годы участились случаи передачи вируса гриппа тип А от птиц к людям с тяжелыми последствиями в районах близкого контакта птиц с человеком в различных районах земного шара [5].

Литература:

1. Химическая энциклопедия М.- 1988г.- т.1.С. 607
2. Головач О.С., Махонин И.К., Фесенко А.В., Щербаков В.А., Чебышев А.В. Модифицированный графит и способ его получения // Патент № 2198137.- дата заявления 2002.02.10.
3. Килбурн Э. Будущие гриппозные вакцины и использование генетических рекомбинантов. // Бюллетень ВОЗ. Грипп Гонконг 1969. – т.41 - №3-5. – С.657-659.
4. Lowry O.K., Roenbrough N.J, Faff N.J, Randal R.J. Protein measurement with folin reagent. J.Biol.Chem.,-1951, -Vol. 193,С. 265-267.
5. Weekly Epidemiology Record // Avian Influenza Fact Sheet, April-2006. Vol.81, N-14, P.129-136.